

④ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公表

④ 公表特許公報(A)

昭60-501776

④ 公表 昭和60年(1985)10月17日

④ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

審査請求有

G 01 N 33/543
A 61 K 39/00
C 12 Q 1/007906-2G
7043-4C
8213-4B

予備審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

(全9頁)

④ 発明の名称 新規なイムノアッセイ法およびその使用キット

④ 特 願 昭59-504454

④ 出 願 昭59(1984)11月16日

④ 翻訳文提出日 昭60(1985)7月18日

④ 国際出願 PCT/US84/01888

④ 国際公開番号 WO85/02258

④ 国際公開日 昭60(1985)5月23日

優先権主張 ④ 1983年11月18日 ④ 米国(US) ④ 553219

④ 発 明 者 クレーグル、リンダ キヤサリ アメリカ合衆国 92117 カリフォルニア州サン ディエゴ カド
ン ウエイ 4949④ 発 明 者 ハリス、ポール シー アメリカ合衆国 92686 カリフォルニア州 ヨーバリンダ コー
レ ボニタ 4740④ 出 願 人 ベックマン インスツルメンツ アメリカ合衆国 92634 カリフォルニア州 フラートン ハーバ
ー ボルバード 2500

④ 代 理 人 弁理士 松永 宣行

④ 指 定 国 BE(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), JP, NL(広域特許), SE(広域特
許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

21

請求の範囲

1. 流体中の抗原物質(Ag)の改良されたイムノアッセイにおいて、該イムノアッセイは(a)該Agに対する抗体(Ab)、(b)該Agに対する可溶性標識抗体(L-Abs)、および(c)固体担体(SC)に結合した該Agに対する抗体(Abs)から成る群から選択した少なくとも1つの第1存在物に、該流体を接触させることとからなる型のものであり、該流体を少なくとも1種の異なる可溶性標識抗体(L-Abs)、および少なくとも1種の異なる固体担体(SC)に結合した該Agに対する抗体(Abs)、および少なくとも1種の異なる該Agに対する抗体(Abs)から成る群から選択した少なくとも1つの付加的存在物に接触させることを特徴とし、

(i) 該付加的存在物の各々は、その対応する第1存在物の該Agに対する平均親和定数(K)より低い該Agに対するKを有し、

(ii) 該付加的存在物をフック効果を回避するのに十分な量で存在させ、

(iii) 該SC₁を該SC、および少なくとも1つの異なる固体担体(SC₂)およびそれら(SCおよびSC₂)の混合物から成る群から選択する、

こととする流体中の抗原物質の改良されたイムノアッセイ法。

2. 該イムノアッセイが

(a) 該流体を(i)該Agに対する該可溶性標識抗体(L-Abs)

22

および(ii)該固体担体(SC)に結合した該Agに対する該抗体(Abs)とに接触させて不溶性複合体(L-Abs-Ag-Abs-SC)を形成させること、

(b) 該流体および未反応L-Absから該L-Abs-Ag-Abs-SCを分離すること、および

(c) 該L-Abs-Ag-Abs-SCに結合したL-Absの量あるいは未反応のL-Absの量のいずれかを測定すること

から成る1段階サンドイッチイムノアッセイ法であり、該流体を少なくとも1種の異なる該Agに対する可溶性標識抗体(L-Abs)および少なくとも1種の異なる該固体担体(SC₁)に結合した該Agに対する該抗体(Abs)から成る群から選択された少なくとも1つの付加的存在物に接触させることを特徴とし、

(ii) それぞれの種類の該L-AbsおよびAbs-SC₁は該L-Absおよび該Abs-SCの該Agに対する平均親和定数Kよりも低い(K)を有する。

ものとする請求の範囲第1項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

3. 該付加的存在物が該L-Absである請求の範囲第2項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

4. Abs₁, Abs₂, Abs₃, およびAbs₄をそれぞれモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびそれらの混合物から成る群から独立して選択する。請求の範囲第2項に

記載の改良されたイムノアッセイ法。

5. Ab_a および Ab_e がモノクローナル抗体である請求の範囲第2項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

6. 該付加的存在物が該 $L - Ab_a$ である請求の範囲第4項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

7. 該イムノアッセイが

(a) 該液体を固体担体 (SC) に結合した該抗体 (Ab_b) に接触させて不溶性複合体 ($SC - Ab_b - Ag$) を形成させること；

(b) 該 $SC - Ab_b - Ag$ を可溶性標識抗体複合体 ($SC - Ab_b - Ag - Ab_a - L$) に接触させること；

(c) 該 $SC - Ab_b - Ag - Ab_a - L$ を未反応 $L - Ab_a$ から分離すること；および

(d) 該 $SC - Ab_b - Ag - Ab_a - L$ に結合した $L - Ab_a$ の量、あるいは未反応 $L - Ab_a$ の量のいずれかを測定すること；

から成る2段階サン、ディッチイムノアッセイであり、ステップ(b)において該 $SC - Ab_b - Ag$ を少なくとも1種の異なるタイプの可溶性標識抗体 ($L - Ab_a$) と接触させることを特徴とし、

(i) 各タイプの該 $L - Ab_a$ は該 $L - Ab_a$ の該 Ag に対する平均親和定数 K よりも低い (K) を有するものとする請求の範囲第1項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

8. Ab_a , Ab_b および Ab_d をそれぞれモノクローナル抗

体、ポリクローナル抗体およびそれらの混合物から成る群から独立して選択する請求の範囲第5項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

9. Ab_a および Ab_e がモノクローナル抗体である請求の範囲第7項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

10. 該イムノアッセイが

(a) 複合体 $Ab - Ag$ を形成するために該液体を該 Ag に対する該抗体 (Ab) に接触させること；および

(b) 形成した $Ab - Ag$ の量を測定すること；

から成る直接比濁分析イムノアッセイであり、該液体を少なくとも1種の付加的抗体 Ab_e と接触させることを特徴とし、各種類の該 Ab_e は該 Ab の該 Ag に対する平均親和定数 K よりも低い該 Ag に対する (K) を有するものとする請求の範囲第1項に記載の改良されたイムノアッセイ法。

11. 各種の付加的 Ab_e がモノクローナル抗体である請求の範囲第10項に記載の改良された直接比濁分析イムノアッセイ法。

12. 各種の付加的 Ab_e がポリクローナル抗体である請求の範囲第16項に記載の改良された直接比濁分析イムノアッセイ法。

13. (a) 抗原物質 (Ag) に対する抗体 (Ab)、(b) 該 Ag に対する可溶性標識抗体 ($L - Ab_a$)、および(c) 固体担体 (SC) に結合した抗体 (Ab_b) から成る群から選択した少なくとも1つの第1存在物からなる複体の改良された試験において、

該試験がさらに少なくとも1種の異なる可溶性標識抗体 ($L - Ab_e$)、少なくとも1種の異なる固体担体 (SC_1) に結合した該 Ag に対する抗体 (Ab_d)、および少なくとも1種の異なる該 Ag に対する抗体 (Ab_e) から成る群から選択した少なくとも1つの付加的存在物を含むことを特徴とし、

(i) 該付加的存在物はそれぞれその対応する第1存在物の該 Ag に対する平均親和定数 K よりも低い (K) を有し

(ii) 該試験をイムノアッセイで用いる場合、該付加的存在物をフック効果を回避するのに十分な量で存在させる

14. 該 SC_1 を該 SC、少なくとも1種の異なる固体担体 (SC_2) およびそれら (SC および SC_2) の混合物から成る群から選択するものとする、

改良された試験。

14. (a) 該 Ag に対する該 $L - Ab_a$ ；および

(b) 該 SC に結合した該 Ab_b

から成る型の試験であり、該試験がさらに少なくとも1種の異なる該 Ag に対する可溶性標識抗体 ($L - Ab_e$) および少なくとも1種の異なる固体担体 (SC_1) に結合した該 Ag に対する抗体 (Ab_d) から成る群から選択した少なくとも1つの付加的存在物を含むことを特徴とし、

(i) 各種の該 $L - Ab_e$ および該 $Ab_d - SC_1$ は該 $L - Ab_a$ および該 $Ab_b - SC$ の該 Ag に対するそれぞれの平均親和定数 K よりも低い K を有するものとする

請求の範囲第13項に記載の改良された試験。

15. (a) 該 Ag に対する該 $L - Ab_a$ (および該 Ag に対する該 $L - Ab_e$)_x から成る第1単位；および

(b) 該 $Ab_b - SC$ (および該 $Ab_d - SC_1$)_y から成る第2単位

から成り、x および y は0または1、ただし x と y が同じ場合は x と y は1とする請求の範囲第14項に記載の改良された試験。

16. x が1で y が0である請求の範囲第15項に記載の改良された試験。

17. 該 Ab_a , Ab_b , Ab_e および Ab_d をそれぞれモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびそれらの混合物から成る群から独立して選択する請求の範囲第7項に記載の改良された試験。

18. 該 Ab_a および Ab_e がモノクローナル抗体である請求の範囲第17項に記載の改良された試験。

19. 該 Ab から成る型の試験であって該試験がさらに少なくとも1種の異なる Ab_e を含むことを特徴とし、異なる種類の該 Ab_e はそれぞれ、該 Ab の該 Ag に対する K よりも低い該 Ag に対する K を有するものとする特許請求の範囲第13項に記載の改良された試験。

20. 該 Ab_e をそれぞれモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびそれらの混合物から成る群から独立して選択する請求の範囲第19項に記載の改良された試験。

新規なイムノアッセイ法およびその使用キット

発明の背景

1. 発明の分野

本発明はイムノアッセイ法およびその使用キットに関するものである。

2. 先行技術の説明

現在、イムノアッセイにはきわめて多くの型がある。例を挙げると、少くとも2つの抗体に結合する抗原の1段階あるいは2段階サンドイッチイムノアッセイが知られている(1~4)。例えば、米国特許第4,244,940号(2)には、測定すべき抗原(Ag)を含む試料、その抗原に対する標識抗体(L-Ab_a)、固相支持体(SC)に結合した抗原に対する抗体(Ab_b)を一緒に水性培地における単一温置(incubation)法あるいは単一温置段階に付して、実質的に安定な懸濁液を形成させて2相系を生成するサンドイッチイムノアッセイ法が開示されている。この2相系の固相部分にAb_b-SCが含まれ、この部分はAgに結合されており、またそのAg部分もL-Ab_a部分に結合されることとなる(L-Ab_a-Ag-Ab_b-SCとして表わされる)。2相系の液相部分には、L-Ab_aの未結合部分が含まれている。固相と液相を分離して、そのいずれかの相をL-Ab_aについて分析するものであるが、そのL-Ab_a濃度が試料中のAg濃度の関数となる。米国特許第

4,244,940号(2)には、この単一温置法あるいは単一温置段階を使った2-部位イムノアッセイでは、分析の進行が単純化され、短縮され、より便利になって、2回以上の温置を必要とする分析法を上回る重要な利点が得られることが教示されている。さらに、米国特許第4,244,940号(2)には、分析法におけるこうした改良は精度、特異性、安定性などの客観される検定特質を維持したまま達成され、加えて、時間設定、添加およびその他の操作を減らすことが少なくなることが教示されている。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイは、2つの抗体と同時に結合できるあらゆるAgの存在および濃度の決定に使用することができる。このAg集団としては、胎盤性、下垂体性、カルシウム調節性および副腎髄質性のポリペプチドホルモン、タンパク質、およびタンパク質片；様々な種類の免疫グロブリン(抗体)；ウィルス性、ウィルスサブユニット性、細菌性、および原生動物性有機物あるいは粒子；毒素；薬物、酵素、および腫瘍関連抗原、が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイで使用する抗体は、容易できる特異性と親和性を持ってAgと結合する物質であればどんなものでもよい。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイでは、一般に知られている多くのトレーサーを使ってL-Ab_a

を標識してもよい。このトレーサーとしては、放射性標識、蛍光標識、酵素標識などがあるが、これらに限定されるものではない。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイの重要な成分はAb_bのためのSCである。SCは、(a)Ab_bに結合することができ、(b)ピペットによる採取、遠心分離などの操作の間に都合よく取扱うことができ、(c)低い非特異的吸着性を示すかまたはそうした吸着性を示すように処理することができなければならない。

従来のサンドイッチイムノアッセイおよび1段階サンドイッチイムノアッセイの欠点が1つ報告されている(3, 5~7)。さらに詳しくは、これらの著者は、Agの高濃度における誤ったネガティブ結果あるいは「フック効果」(hook effect)のために従来法や1段階サンドイッチイムノアッセイでは結果を誤解する危険の可能性があることを見出した。

野村氏ら(6)は、人間のローフェットタンパク質(AFP)の決定のためのモノクローナル抗体を用いた1段階サンドイッチイムノアッセイに関して、この点を論じているが、彼らは、「多量の固定化および標識化抗-AFPを用いれば、理論的には抗原過剰区域の阻害をさけることができるが、実用的ではない」と述べている。この提案が実用的でない理由の1つとしては、野村氏らが提案したようにさらに多量の標識化抗-AFPを用いた場合、非特

異的吸着は使用するL-Ab_aの濃度に比例するため、結果的に分析では非特異的吸着が高くなるということが挙げられる。この提案が実用的でないもう一つの理由は、標識化抗-AFPをこのように付加的に多量に用いると、分光光度計を使用しなければならない酵素あるいはその他の標識を用いる場合に分析の検限範囲が減少してしまうことである。

マイルスら(7)は、二段階サンドイッチイムノアッセイに関してこの欠点を述べているが、彼らは、最初の温置の後、洗浄を反復すれば、高用量のフック効果を防げるということに言及している。しかし、高用量のフック効果を防ぐこの方法は冗長で時間がかかる。

現在までのところ、1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイにおいて、その誤ったネガティブあるいはフック効果現象を防止または回避するために有効な方法は提案されていない。

当業者が知られているもう1つのイムノアッセイは、直接比濁分析イムノアッセイである。直接比濁分析イムノアッセイは、複合体Ab-Agを形成するために、抗原物質(Ag)を含む流体をそのAgに対する抗体(Ab)に接触させることから成る。形成されたAb-Agの量の測定は、分析された流体中のAg量に正比例する。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイと同様に、Agの高濃度における誤ったネガティブ結果ある

いは“フック効果”のために結果を誤解する危険の可能性がある。

直接比濁分析イムノアッセイの場合、そうした誤解を防ぐための電気機械的方法はいくつかあるが、この場合の誤まったネガティブのあるいはフック効果現象を防止または回避するための化学的方法は知られていない。

従って、この問題を防止あるいは回避したイムノアッセイ方法およびそのキットを得ることが非常に望まれていた。

発明の要約

本発明によれば、フック効果を回避すると同時に以前のイムノアッセイが持っていた利点を維持した改良されたイムノアッセイ方法およびその使用キットが提供される。

一般に、本発明は、流体中の抗原物質 (A_g) のイムノアッセイを改良するものである。本発明のイムノアッセイは、 A_g に対する抗体 (Ab)、 A_g に対する可溶性懸濁抗体 ($L-Ab_a$)、および固体担体 (SC) に結合した A_g に対する抗体 (Ab_b) から成る群から選択した少くとも1つの第一存在物に流体を接触させることからなる型のものである。このイムノアッセイは、少くとも1種の異なるタイプの A_g に対する可溶性懸濁抗体 ($L-Ab_a$)、少くとも1種の異なるタイプの固体担体 (SC_1) に結合した A_g に対する抗体 (Ab_d)、および少くとも1種の異なる

タイプの A_g に対する抗体 (Ab_e) から成る群から選択した少くとも1つの付加的存在物に流体を接触させることを特徴とするものである。

SC_1 は、 SC 、1あるいは2以上の異なる固体担体 (SC_2)、およびそれら (SC および SC_2) の混合物から成る群から選択される。

付加的存在物はそれぞれ、対応する第1存在物の A_g に対する平均親和定数 (K) より低い A_g に対する定数 K を有する。さらに、その付加的存在物はフック効果を回避するのに十分な量だけ存在する。

より詳細には、本発明は、改良された1段階サンドイッチイムノアッセイに関する。本発明のこの1段階サンドイッチイムノアッセイは、

a) 流体を (i) $L-Ab_a$ 、および (ii) SC に結合した Ab_b 、に接触させて、不溶性複合体 ($L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$) を形成すること；

b) 流体および未反応 $L-Ab_a$ から該 $L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$ を分離すること；および

c) $L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$ に結合した $L-Ab_a$ 量、あるいは未反応の $L-Ab_a$ 量のいずれかを測定すること；

から成る。

本発明の改良された1段階サンドイッチイムノアッセイは、1種またはそれ以上の異なるタイプの $L-Ab_a$ お

よび1種またはそれ以上の異なるタイプの SC_1 に結合した Ab_d から成る群から選択した少くとも1つの付加的存在物に流体を接触させることを特徴とし、

(i) 異なる種類の $L-Ab_a$ および Ab_d-SC_1 はそれぞれ、 $L-Ab_a$ および Ab_b-SC の A_g に対するそれぞれの定数 K よりも低い A_g に対する K を有し；

(ii) 付加的存在物をフック効果を回避するのに十分な量で存在させるものとする。

さらに詳しくは、本発明は改良された2段階サンドイッチイムノアッセイに関する。このイムノアッセイは、

a) A_g を含む流体を Ab_b-SC と接触させて、不溶性複合体 ($Ag-Ab_b-SC$) を形成すること；

b) 該 $Ag-Ab_b-SC$ を $L-Ab_a$ と接触させて、拡大した不溶性複合体 ($L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$) を形成すること；

c) 未反応 $L-Ab_a$ から $L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$ を分離すること；および

d) $L-Ab_a-Ag-Ab_b-SC$ に関連した $L-Ab_a$ 量もしくは未反応 $L-Ab_a$ 量のいずれかを測定することから成る型のものである。

本発明の改良された2段階サンドイッチイムノアッセイは、ステップ (b) で $Ag-Ab_b-SC$ を1種またはそれ以上の異なるタイプの $L-Ab_a$ と接触させることを特徴とし、その異なるタイプの $L-Ab_a$ は各々、 $L-Ab_a$ の定

数 K よりも低い A_g に対する K を有し、かつ $L-Ab_a$ はフック効果を回避するのに十分な量で存在させるものとする。

さらに詳しくは、本発明は改良された直接比濁分析イムノアッセイに関する。このイムノアッセイは、

a) 複合体 $Ab-Ag$ を形成させるために流体を Ab と接触させること；および

b) 形成した $Ab-Ag$ 量を測定すること；

から成る型のものである。

本発明の改良された直接比濁分析イムノアッセイは、少くとももう一種類の抗体 Ab_e に流体を接触させることを特徴とするものである。各種類の Ab_e は Ab_a の A_g に対する定数 K より低い A_g に対する K を有し、かつ、フック効果を回避するのに十分な量で存在させる。

また、改良された試薬も本発明の一般的範囲内にある。

この改良された試薬は、 Ab 、 $L-Ab_a$ および Ab_b-SC から成る群から選択した少くとも1つの第1存在物からなる型のものである。本発明の試薬は、少くとも1種の異なるタイプの $L-Ab_a$ 、少くとも1種の異なるタイプの Ab_d-SC_1 および少くとも1種の異なるタイプの Ab_e から成る群から選択した少くとも1つの付加的存在物を含むことを特徴とするものである。試薬をイムノアッセイで使用する場合、付加的存在物を、フック効果を回避するのに十分な量で存在させる。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイの場合、試薬はL-Ab_aおよびAb_b-SCから成る型のものである。本発明の改良された試薬は、1種またはそれ以上の異なったL-Ab_aおよび1種またはそれ以上の異なったSC₁に結合したAb_dから成る群から選択した少なくとも1つの付加的存在物をさらに含むことを特徴とするものである。試薬をこのイムノアッセイで使用する場合、その付加的存在物をフック効果を回避するのに十分な量で存在させる。

直接比濁分析イムノアッセイの場合、試薬はAbを含む型のものである。本発明の改良された試薬は、直接比濁分析イムノアッセイで使用する場合には、少なくとも1種の異なったAb_aをフック効果を回避するのに十分な量を含む。

好適な実施例の説明

様々な種類のL-Ab_a、Ab_d-SC₁およびAb_bのAgに対する平均親和定数(K)はそれぞれL-Ab_a、Ab_b-SC₁およびAbのAgに対する各々のKよりも低くなければならない。この制限によって、後述範囲において前者の存在物が後者の存在物とほとんど競争しないことが保証される。この効果を達成するためには、異なった種類のL-Ab_a、Ab_d-SC₁およびAbのAgに対するKは各々、L-Ab_a、Ab_b-SC₁およびAbのAgに対するそれぞれのKよりも少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍低いことが好ましい。

Ab_a、Ab_b、Ab_c、Ab_dおよびAb_eはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびそれらの混合物から成る群から各々独立して選択される。例えば、1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイでは、(a) Ab_a、Ab_b、Ab_cおよびAb_dはモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である；(b) Ab_aとAb_eはモノクローナル抗体で、Ab_bとAb_dがポリクローナル抗体である；あるいは(c) Ab_aとAb_cがポリクローナル抗体であって、Ab_bとAb_dはモノクローナル抗体であってもよい。1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイでは、Ab_cおよびAb_dは好ましくはモノクローナル抗体である。

以下の例では本発明をさらに説明するためのものであって開示された発明を制限するものではない。

例1

IgE酵素イムノアッセイ(先行技術)

物質

- 特異的IgE部位に指向したモノクローナル抗体で被覆されたポリスチレンビーズ(Ab_b-SC)。
- 異なったIgE部位に指向したホース・ラティッシュペルオキシターゼ-標識抗体(L-Ab_a)、定数Kは約 2×10^{10}
- o-フェニレンジアミン
- 過酸化水素
- 停止液

さらに、フック効果の回避をより拡大させたい場合は、(a) L-Ab_aのKとL-Ab_eのK、(b) Ab_b-SCのKとAb_d-SC₁のKおよび(c) AbのKとAb_eのKとの間の差をより大きくすることが必要である。

2種以上のL-Ab_a、Ab_d-SC₁あるいはAb_eを使用する場合、好ましくは異なった種類はそれぞれ異なったKを有する。

使用するL-Ab_aの量はフック効果の開始を延期させるのに十分かつ不満足な非特異的吸着を引き起こすに至るまでの量であればいくらかでもよい。さらに詳細には、この量は試薬1 mlに対し約0.01~約1 μgの範囲である。

使用するAb_dの量はフック効果の開始を延期させるのに十分かつSC₁を飽和させるのに必要な量までの量であればいくらかでもよい。さらに詳細には、この量はナスト当り0.1~約10 μgの範囲である。

使用するAb_eの量はフック効果の開始を延期させるのに十分であればどんな量でもよい。

1段階または2段階サンドイッチイムノアッセイにおける本発明の利点を得るためには、L-Ab_aあるいはAb_d-SC₁のいずれかを使用することが唯一必要である。標識抗体の濃度をより簡単に調整できるため、またL-Ab_aに対するL-Ab_aの割合をより簡単に調整できるため、付加的存在物としてはL-Ab_eの使用が唯一好ましい。

○ IgE標準 0, 10, 25, 75, 200, 400 IU/ml

○ 蒸留緩衝液

実験

1. すべての成分および試料を室温と平衡にし、使用前に十分混合する。
2. 20 μL標準(ゼロ用量を含む)または試料を各試験管に加える。
3. 各試験管に300 μL希釈複合体を加える。
4. 試験管立てを静かに振って混ぜ合わせる。気泡をぬくために試験管立てを軽くたたく。
5. ピンセットを使って、コンテナからビーズバスケットを取り除く。水切りできるまでコンテナを支えて逆さにしたキャップの上に置く。各試験管にビーズを1個ずつ入れる。
6. 試験管立てを静かに振って混合する。必要ならば試験管立てを軽くたたいて気泡を除く。
7. 試験管を37±1℃の水浴で30分間温置する。
8. 温置の最後の5分間に蒸留緩衝液を調整する。鋭利の取扱いにはプラスチック製ピンセットを用いる。
9. 各試験管に約3 mlの蒸留水を満たしてビーズを洗浄し、吸引する。さらに2回繰り返す。
10. 一定時間ごとに各試験管に300 μLの酵素蒸留緩衝液を加える。
11. 試験管立てを振って完全に混合し、光を除外する。

ために試験管にかきいをする。

12. 20℃～25℃で30±1分間置する。
13. 一定時間ごとに、1mlの停止液を各試験管に加える。着質添加のために使用するので、同じ順序で同じタイミングで添加を行う。静かに振って混ぜる。
14. 分光光度計の零点校正を行い、492nmで試料と標準の吸光度を測定する。試料プランクの吸光度（ゼロ用量）を差引いて標準および試料各々の修正吸光度を計算する。

算定

1. 半対数グラフ用紙に、縦型軸を吸光度（0～200A）で標識し、対数軸を標準の濃度（10～400IU/ml）で標識する。
2. 標準の平均修正吸光度をプロットし、点を直線で結んで標準曲線をひく。
3. 試料の修正吸光度を使って標準曲線からの試料濃度を書き入れる。

この実験の結果を表1に示す。

例2

IgE酵素イムノアッセイ（本発明）

例1に記載の物質、実験および算定を1部修正して用いた。唯一の修正は、異なるIgE部位（L-Ab₂）に指向し、Kが約 3×10^7 であるもう1種のホース・ラディ

ッシュ通酸化物-糖鎖抗体を使用したことである。この実験の結果も表1に示す。

表 1

IgE, IU/ml	吸光度	
	先行技術 (例1)	本発明 (例2)
0	0.089	0.126
10	0.161	0.186
25	0.282	0.323
75	0.614	0.634
200	1.064	1.099
400	1.396	1.592
1,000	1.916	2.226
4,000	1.994	2.808
8,000	1.551	2.718
16,000	1.387	3.018
40,000	1.013	2.826

例1および例2のIgE検定ではIgEの機能範囲は1ml当たり0～400IUである。従って、表1に記載のデータから、先行技術では、IgE濃度が8000IU/mlより大きい場合、フック効果があるために誤ったネガティブ結果がおこることがわかる。これに対し、本発明の方法およびキャットでは、少くとも40,000IU/mlのIgE濃度K

についてはフック効果が回避される。表1から明らかなように、機能範囲で信号が大幅に上昇することなく、フック効果を回避することができる。

例3

HCG酵素イムノアッセイ（先行技術）

物質

- 特異的HCG部位に指向したモノクローナル抗体で被覆したポリスチレンビーズ（Ab₁-SC）。
- 異なるHCG部位に指向したホース・ラディッシュペルオキシターゼ-糖鎖抗体（L-Ab₂）、Kは約 8×10^{10} 。
- o-フェニレンジアミン
- 通酸化水素
- 停止液
- HCG標準 0, 10, 25, 75, 200, 400IU/ml
- 着質緩衝液

実験

1. すべての成分と試料を室温と平衡にし、使用前に十分混合する。
2. 200μl標準（ゼロ用量を含む）あるいは試料を各試験管に加える。
3. 200μl着質緩衝液を各試験管に加える。
4. 試験管立てを静かに振って混ぜ合わせる。試験管立てを軽くたたいて気泡をぬく。
5. 試験管立てを振って確実に混ぜ合わせ、光を除外するために試験管にかきいをする。
6. 20℃～25℃で30±1分間置する。
7. 一定の時間ごとに、各試験管に1ml停止液を加える。着質添加のために使用するので、同じ順序、同じタイミングで添加を行う。静かに振って混ぜる。
8. 分光光度計の零点校正を行い、492nmで試料と標準の吸光度を測定する。試料プランクの吸光度

ピンセットを使って、コンテナからビーズバスケットを取り除く。水切りできるまでコンテナを支えて、逆さにしたキャップの上に置く。各試験管にビーズを1個ずつ入れる。

試験管立てを静かに振って混合する。必要ならば試験管立てを軽くたたいて気泡を除く。

試験管を臨床的ローターの上で190±10RPM、20℃～25℃、45分間置する。

混置の最後の5分間に着質溶液を調整する。旋剤の取扱いにはプラスチック製ピンセットを使用する。

各試験管に約3mlの蒸留水を滴りしてビーズを洗浄し、吸引する。さらに2度繰り返す。

一定の時間ごとに、300μlの酵素着質溶液を各試験管に加える。

(ゼロ用量)を差し引いて標準および試料の各々の修正吸光度を計算する。

算定

1. 半対数グラフ用紙に、縦軸を吸光度 (0~200A) で標識し、対数軸を標準の濃度 (10~100 IU/ml) で標識する。
 2. 標準の平均修正吸光度をプロットし、各点を直線で結んで標準曲線をひく。
 3. 試料の修正吸光度を使って標準曲線からの試料濃度を内挿する。
- この実験の結果を表Ⅰに示す。

例 4

HCG 酵素イムノアッセイ (本発明)

例 3 に記載した物質、実験、および算定を 1 部修正して用いた。唯一の修正は、異なる HCG 部位に指向した K が約 2×10^3 であるもう 1 種のホース・ラディッシュ過酸化酵素-標識抗体 (L-Ab₂) を使用したことである。この実験結果も表Ⅰに示す。

表Ⅰ

HCG mIU/ml	吸光度	
	先行技術 (例 3)	本発明 (例 4)
0	0.090	0.092
1	0.101	0.108
2.5	0.130	0.132
5	0.173	0.188
10	0.290	0.284
25	0.546	0.557
50	0.952	0.932
100	1.520	1.592
1000	3.82	3.855
10000	1.64	5.514
54880	0.66	4.37
128000	0.42	3.38

例 3 および例 4 の HCG 検定において、HCG の機能範囲は 1 ml 当たり 0~100 mIU である。従って、表Ⅰに記載されたデータから、先行技術では、HCG の濃度が 10000 mIU/ml 以上の場合、フック効果があるために顕著なネガティブ効果がおこることがわかる。これに対して、本発明の方法およびキャットでは、少くとも 128000 mIU/ml の HCG 濃度についてはフック効果が回避される。

表Ⅰから明らかのように、機能範囲で信号が大幅に上昇することなくフック効果を回避することができる。

本開示に基づいて、その他多くの変更態様や修飾が当業者にとっては当然理解できるであろう。これらは本発明の範囲内に含まれるものである。

参 考 文 献

1. 米国特許第 4,376,110 号
2. 米国特許第 4,244,940 号
3. マイルス他, *Analytical Biochemistry*, **61**: 209-224 (1974)
4. ウェティラ他, *Journal of Immunological Methods*, **42**: 11-15 (1981)
5. Ng 他, *Clin. Chem.*, **29**(6): 1109-1113 (1953)
6. 野村他, *Journal of Immunological Methods*, **56**: 13-17 (1983)
7. マイルス他, 臨床医学および研究における放射線イムノアッセイおよび関連手法に関するシンポジウム, 国際原子力機関、ウィーン・オーストリア (1973), 149~164 頁。

手 続 補 正 書

昭和60年8月14日

特許庁長官 宇 賀 道 郎 殿

1. 事件の表示

国際特許出願番号 PCT/US 84/01888

2. 発明の名称

新規なイムノアッセイ法およびその使用キット

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 ベックマン インストルメンツ
インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目4番17号
麗友ビル 電話 (434)0887番(代)

氏 名 (7002) 弁理士 松 永 宣 行

5. 補正命令の日付

(目 発)



6. 補 正 の 対 象

明細書及び請求の範囲の翻訳文

7. 補 正 の 内 容

別紙のとおり添書した明細書及び請求の範囲の翻訳文を補充する。(但し、内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

添書した明細書及び請求の範囲の翻訳文 各1通

国 際 調 査 報 告

International Application No. PCT/US 84/01888

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN accord with the International Patent Classification (IPC) and the International Classification of Diseases (ICD) according to International Patent Classification (IPC) or to International Classification of Diseases (ICD)		
IPC: G 01 N 33/53; G 01 N 33/543; G 01 N 33/577		
2. FIELD SEARCHED		
Classified by: G 01 N		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of Document	Relevant to Claim no.
A	Molecular Immunology, vol. 17, published in 1980, Pergamon Press Ltd. (GB) J. Staeneyard et al.: "The development of difference turbidimetric analysis for monoclonal antibodies to human IgG", see pages 1315-1318	
A	Clinical Chemistry, vol. 27, no. 11, published in November 1981 (Easton, Pennsylvania, US) E.D. Savier et al.: "Monoclonal antibodies in clinical immunology", see pages 1797-1806	
A	EP, A, 0045103 (AKSO N.V.) 3 February 1982	
A	EP, A, 0048357 (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION) 31 March 1982	
A	EP, A, 0028133 (DYNASCIENTES CORPORATION) 6 May 1981	
4. REMARKS		
Date of the Second Examination of the International Patent: 27th March 1985		
Date of Meeting of the International Patent Commission: 17 APR. 1985		
International Searching Authority: EUROPEAN PATENT OFFICE		

International Application No. PCT/US 84/01888 -2-

A. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)	
Category	Character of Document, and relevant, where appropriate, of the relevant passages
A	EP, A, 0062892 (AMERICAN ROCHIST CORP.) 20 October 1982

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/US 8401888 (SA 8420)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EEP file on 12/04/83

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0045103	03/02/82	NL-A- 8004308	01/03/82
		AU-A- 7307881	04/02/82
		JP-A- 57085051	28/05/82
EP-A- 0048357	31/03/82	JP-A- 57079455	18/05/82
		SE-A- 8006424	13/03/82
		CA-A- 1171780	31/07/84
EP-A- 0028133	06/05/81	JP-A- 56087757	08/05/81
		AU-A- 6285180	30/04/81
		CA-A- 1146856	24/05/81
EP-A- 0062892	20/10/82	JP-A- 57167653	15/10/82
		US-A- 4468856	04/09/84

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

第1頁の続き

⑨発明者 リー、シー - ユン

アメリカ合衆国 92069 カリフォルニア州 サン マルコス マ
クレランド ストリート 1311

⑩発明者 タン、カー コン

アメリカ合衆国 92008 カリフォルニア州 カールスバッド ア
ニエロ ウエイ 7739⑪発明者 ヴオーディアン、モートン ア
ランアメリカ合衆国 92026 カリフォルニア州エスコンディード サ
リー プレース 1770